

特表平7-502723

第3部第2区分

(43) 公表日 平成7年(1995)3月23日

(51) Int. Cl. <sup>4</sup> C 0 7 K 14/79 A 6 1 K 38/16 C 1 2 N 5/10	識別記号 8318-4H	序内整理番号 8314-4C 8060-4B	F I A 6 1 K 37/14 C 1 2 N 15/00 Z N A A
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-505855  
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)2月6日  
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)8月6日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US92/00928  
 (87) 国際公開番号 WO92/18550  
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)8月20日  
 (31) 優先権主張番号 652, 869  
 (32) 優先日 1991年2月8日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (51) 指定国 EP (A.T., BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), CA, JP

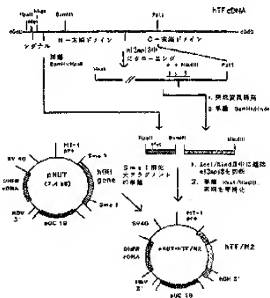
(71) 出願人 ザ・ユニバーシティ・オブ・バーモント・アンド・ステイト・アグリカルチュラル・カレッジ  
 アメリカ合衆国バーモント州06405バーリントン (番地なし)  
 (71) 出願人 ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュコロンビア  
 カナダ国ブリティッシュ・コロンビア・バンクーバー (番地なし)  
 (74) 代理人 弁理士 小佐島 幸吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み替えトランスフェリン、トランスフェリン単一分子、及びそれらの突然変異体

## (57) 【要約】

金属-結合性が変えられた、又は他の性質を有する組み替えトランスフェリン、トランスフェリン単一分子、及び突然変異体トランスフェリンにつき記載する。組み替えトランスフェリン分子は組み替え分子をコードする発現ベクターを用いて形質転換されたベビーハムスター腎臓細胞などの安定な真核細胞系により機能的形態で発現される。組み替えトランスフェリンは金属の過剰負荷に苦しむ患者において過剰の毒性金属を結合して除去する金属キレート化治療に用いることができる。









れるものでなくほかから除去されるので自費である。さらに肝臓の薬一分子は結核菌の膜上のトランスフェリンレセプターと結合しないので、これらの組織に結合し送らない。さらにヒトトランスフェリンの薬一分子はおそらくヒトの体により「自己」と認識され、従って免疫学的反応を引き起こさない。

さらに突然変異体単一分子は、金属イオン選択性が変わるように設計することができる。ホレート化剤を用いて他の遷移金属、例えば銅、水銀、カドミウム、鉛及び亜鉛の体から抽出することができる。

ナレート化処理の塩化、金属をナレート化して弱酸性を等塩基下に下げるのに十分な量で組み替えトランスフェリンを塩基に投与する。一般にこれは生理学的に許容し得るレベル、例として食塩水中で、希釈口の経路で（典型的に投与所）投与する。

超甲基化モノトランスフェリンは、植物組織培養のための養分源として使用することができる。トランスフェリンは成長経路による鉄吸収に必要である。超甲基モノトランスフェリンの便用により、モノトランスフェリンから精製したトランスフェリンは同様の養分源（例えは、 $\gamma$ 又は、卵

本税額を以下の増徴率によりさらに増徴する。

555-02

1. アミノ-アセチル-CoAを合成経路からトランスフェリン単一分子の形

柯叶

T4 DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼI (フェノールフラグメン

Biotechnology にも購入した。創刊エディタールーアは Pharmacia PL Biochemicals の Research & Development Laboratories にも購入した。オランダオキシダテックは Applied Biosystems の 280A DNA 合成装置と合成した。ドイツのローアは、スウェーデンの Schleicher & Schuell から、<sup>32</sup>P-標識アデノシナドを New England Nuclear から、ヒトロサートラニスフォルミド酸は Sigma Chemical Company から、ホモポリマー標識アデノシナドは Protos (Syngene Biotechnology) 社から、Biotec Research Laboratories から、プロトコル (Protocols) 発芽スクリーニング標識は Promega から、コロニドプレート (Colonies) 検出は oide-directed 東京薬品株式会社 (Dai Nippon) から、Dubček の家庭用増殖装置は Czechoslovakia から、及びヒトラニスフォルミド酸は Czechoslovakian Academy of Sciences から得た。これらの試料はすべて分析用又はそれ以上の純度であった。

方法

ヒト肉芽トランスフェリン (hTF) cDNAの単離 Dr. S. I. Wara Orkin, (Harvard University) 提供による E. coli 発現ベクター-pKT-218 (Prochownik, E. V. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258, 1117-1121) を用いて、ヒト肉芽トランスフェリン cDNAを E. coli に導入し、発現させる。

図1: 83839-9(3349)中に高濃度なヒト肝臓cDNAライブラリー、血漿下のアミノ酸第812位置をコードするオグサタレオチドをハイブリッド系統プローブとして用いてスクリーニングした。オグサタレオチドはYang, et. al. (1984) *Exp. Nucl. Acid. Sci. USA* 31: 2752-2755により報告されたヒトF<sub>1</sub>cDNA配列のオグサレオチド8-11に相当した。オグサタレオチドはアポリオチドキナーゼ及びGTP $\gamma$ Sを用いて末端-修飾し(Chomcos, G. and N. Hay, *Methods* 13: 157-162, 1978)。

Enzymol. 65: 78-85). 約10<sup>4</sup>個のコピーのヌクレオチド配列に、特定のクロンの複製とドメインアライメントを比較し、類似性の割合を、それらのCD 3及びCD 3m 19ヌクレオチドを用いて標準的な方法で得た (Mansueti, T. et al. (1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).  
Messing, J. (1982) Methods Enzymol. 65: 120-78; Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-64 67).

長型ベクター及び複製宿主 異源表現ベクター-pNUT (Palmiter, R. D. et al (1987) Cell (Cambridge, MA) 50: 435-443) 及びペシーハムスター腎臓(BHK)細胞はDr. Richard D. Palmiter (Howa

erty of Washington) の提供による。合成、  
カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (Sep-Pak,  
Waters Associates; Atkinson, T. and  
Smith, M. (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (Gait, M. J., Ed.) pp86-81. IRL Press, Ox-  
ford). Taylor, J. W. et al. (1985) Nucleic Acids Res. 13, 8740-8746 の方法を用  
いることにより、特定の部位の突然変異検出を行った。プラスミド DNA は、E. coli JM101 から分離し、塩化セリウム塩酸溶液を用いた  
塩沈降法により分析された。

を抑制した。0.02%のウラン塩溶液を含む Dulbecco の修正 4 羽玉培地 (DMEM) 中で  $10^{-6}$  M の濃度で約 90% 程度に成長させ、細胞は Scenic 100 cm<sup>2</sup> フラスコ (1.65 × 10<sup>8</sup> cells) で Cell Biol 6: 1439-1488 に記載の 9 羽玉培地 (DMEM) の濃度で約 10 log のプラスとトネド培地にトランスフェクションした。24 時間後、細胞は 9 羽玉のトネド培地 (MT) へと転移させ、50% DMEM に換え、生存細胞を 90% DMEM で数日に選択した。いくつかの欠陥では 90% DMEM へと直接移行を選択した。大腸菌の細胞感受性は、1 × 10<sup>6</sup> ml の MT 培地 + MT 培地 + 細胞 + 大腸菌の菌懸濁液は、1 × 10<sup>6</sup> ml の菌懸濁液を得て期待した。2 × 10<sup>6</sup> M、0.05 mM の濃度濃度で数日に選択した。このように 90% の濃度で細胞を培養した。細胞は 4 羽玉培地に戻した。

## 免疫-沈降及びウエスタンブロッティング

細胞抽出液及び組織ライソートの免疫-沈降、Van Oosel, B. A. et al. (1988) Biochem. Cell Biol. 64: 699-702 の方法により行った。沈降物を  $\text{NaOH}$  の存在下における

12% 聚丙烯アミドゲル上の電気泳動により分離し (Laemmli

, U. K. (1970) Nature (London) 227: 680-685) 、その沈下はセロース膜上にブロッティングした。

プロットを 0.1 mg/ml のゼラチンを含む 0.3% でインキュベ

ートし、その後ツイット-80 洗剤液 (PB 8 中で 2.0% 洗剤液) を

用いて処理し、最後にカルボニルファスター染色液をワザール-ヒッ

18 G 洗液を用い、染色剤の指示に従って発色した。

ア1/免疫沈降 3-フルオロサロシンを塩分除去した F-2/N 中に

1% NMR グループとして導入するために、培養液中に塩分濃度 1%

の L-メチオニン溶液で、L-メチオニンを (Sigma Chemical Company) を用いて溶解した。細胞は D. L-メチ

オニンを含有しない培養液に成長させた後、10 分に成長した。

細胞の抽出液 F-2/N の抽出 収穫した細胞をフェルニルセル

スルホニウムフルオリド中で 0.1% としてプロセッサを溶解し、地

域中のトランスフェリンのすべてを溶解させるのに十分な  $\text{FeCl}_3$ 

(NTA) を加えた。溶液で溶解した後、溶液を溶液用試料として

24 時間、その後  $\text{MgCl}_2$  -Q 溶液に於いて沈降促進した。凍結

トリス-HCl 緩衝液、pH 4 を 5 mM の最終濃度まで調製、試料を

凍結して管片を凍結し、10 mM のトリス-HCl 緩衝液、pH 8.4

で再溶解し、DAB-5-Septacel (Pharmacia) のカ

ラム (2.5 x 8.0 cm) に再溶解した。

その後カラムを両端から  $\text{NaCl}$  の緩衝液 (0-0.3M) を用いて洗脱した。洗脱液を 10 分間分けて  $\text{NaOH}$  -PA 62 に

より分析し、組み立てタンパク質 (M 37, 000) を含む成分を集

めた。そのような成分は、細胞抽出液からの 10 分間分けたの

トランスフェリン及びアルブミンを含む。最初の成分は  $\text{Amino P}$ 

M-10 膜上で 5 mM に溶解した。タンパク質を、100 mM の

水素アミンで中和化した  $\text{Sephadex G-75 Superfine}$  (Pharmacia-PL Biochemicals)

のカラム (2.5 x 9.0 cm) 上のイオン交換にかけた。

タンパク質を 100 mM の  $\text{NaCl}$  で完全に洗脱するために、このカ

ラムを通して 2 個目のクロマトグラフィー洗脱が必要と見られる。この

洗脱で  $\text{Amino P}$  は洗脱され、0 であり、内相ヘムタンパク質 (お

そらくヘムタンパク質) の存在を示している。F-2/N は、50 mM

のトリス-HCl, pH 8.0 中の  $\text{NaCl}$  の緩衝液 (0-0.3M) を用いて  $\text{Polyacrylamide}$  (Pharmacia) のカラム (1x 10 cm) 上で 1 ml/分の流量にて 1 時間かけて  $\text{PA 62}$  に

分析に用いて分析した。3 mM の成分を集めた。タンパク質の純

度を確認するために 2-4 倍のタンパク質  $\text{PA 62}$  のカラムから洗脱した。5% -12% 硝酸アミンを用いて  $\text{NaOH}$  -PA 62 洗脱液、Mahey, D. O. and Seef, U. S. (1978) Biochem. Biophys. Res. 64: 250-255 の方法に従って  $\text{Brown-Brown}$ 、A. and Woodworth, R. C. (1984) J. Biol. Chem. 259: 1866-1870 の方法に従って  $\text{PA 62}$  を行った。1.10 mL のガラスカラム(LKB) 中の 0-50% グラウソス上に 3% の  $\text{Pharm}$ 

alytic, pH 5-8 (Pharmacia) を用いて電気泳動液を

行った。カラムは 1000 V にて 20 mA の最終電流に電圧を調整した。

0.2 mL 中の試料を溶液の半分から回収したものを 0.2 mL の溶液で溶解し

た。その後試料をカラムの表面に滴下し、電圧を 2 時間かけて

た。均相のカラムの底から、0.2 mL の溶液で洗脱した。各成分を  $\text{A}_1$ 及び  $\text{A}_2$  に分けて分析した。各成分  $\text{A}_1$  を含む部分、アミン及び純度を確認するために 2-4 倍のタンパク質  $\text{PA 62}$  のカラムから洗脱した。洗脱は、1 mM の  $\text{NaCl}$ 、1 mM の  $\text{EDTA}$ 、0.5% の酢酸ナトリウ

ムを含む溶液で、pH 8.0 中でインキュベートすることにより、純

度を確認する試料に除去された。アミンタンパク質を  $\text{Centric}$ 

10 (Amicon) 上で 5000 回転に達した。その後水を加えて

2 回、及び 0.1% の  $\text{KCl}$  を用いて 2 回洗脱して再濃縮した。アミンタンパク質は純度で洗脱する傾向があるが、0.1% の  $\text{KCl}$  に加えて洗脱した。アミンタンパク質を  $\text{NaCl}$  の中で 10 mM に4.5 mM で洗脱して洗脱し、その後洗脱液の  $\text{pH}$  (NTA) で調整

した。

組み立て F-2/N の完全な免疫沈降 細胞の抽出液を免疫沈

降し、洗脱液の成分で免疫沈降の組み立て F-2/N の洗脱液を

洗脱した (Foster, W. B. et al. (1982) Transmembr. 2: 684-691)。

タンパク質分析-酵素分解-酵素分解 F-2/N (Lieberman-Zins, J. and Brew, K. (1

ラム (2.5 x 8.0 cm) に再溶解した。

その後カラムを両端から  $\text{NaCl}$  の緩衝液 (0-0.3M) を用いて洗脱した。洗脱液を 10 分間分けて  $\text{NaOH}$  -PA 62 に

より分析し、組み立てタンパク質 (M 37, 000) を含む成分を集

めた。そのような成分は、細胞抽出液からの 10 分間分けたの

トランスフェリン及びアルブミンを含む。最初の成分は  $\text{Amino P}$ 

M-10 膜上で 5 mM に溶解した。タンパク質を、100 mM の

水素アミンで中和化した  $\text{Sephadex G-75 Superfine}$  (Pharmacia-PL Biochemicals)

のカラム (2.5 x 9.0 cm) 上のイオン交換にかけた。

タンパク質を 100 mM の  $\text{NaCl}$  で完全に洗脱するために、このカ

ラムを通して 2 個目のクロマトグラフィー洗脱が必要と見られる。この

洗脱で  $\text{Amino P}$  は洗脱され、0 であり、内相ヘムタンパク質 (お

そらくヘムタンパク質) の存在を示している。F-2/N は、50 mM

のトリス-HCl, pH 8.0 中の  $\text{NaCl}$  の緩衝液 (0-0.3M) を用いて  $\text{Polyacrylamide}$  (Pharmacia) のカラム (1x 10 cm) 上で 1 ml/分の流量にて 1 時間かけて  $\text{PA 62}$  に

分析に用いて分析した。3 mM の成分を集めた。タンパク質の純

度を確認するために 2-4 倍のタンパク質  $\text{PA 62}$  のカラムから洗脱した。5% -12% 硝酸アミンを用いて  $\text{NaOH}$  -PA 62 洗脱液、Mahey, D. O. and Seef, U. S. (1978) Biochem. Biophys. Res. 64: 250-255 の方法に従って  $\text{Brown-Brown}$ 、A. and Woodworth, R. C. (1984) J. Biol. Chem. 259: 1866-1870 の方法に従って  $\text{PA 62}$  を行った。1.10 mL のガラスカラム(LKB) 中の 0-50% グラウソス上に 3% の  $\text{Pharm}$ 

alytic, pH 5-8 (Pharmacia) を用いて電気泳動液を

行った。カラムは 1000 V にて 20 mA の最終電流に電圧を調整した。

0.2 mL 中の試料を溶液の半分から回収したものを 0.2 mL の溶液で溶解し

た。その後試料をカラムの表面に滴下し、電圧を 2 時間かけて

た。均相のカラムの底から、0.2 mL の溶液で洗脱した。各成分を  $\text{A}_1$ 及び  $\text{A}_2$  に分けて分析した。各成分  $\text{A}_1$  を含む部分、アミン及び純度を確認するために 2-4 倍のタンパク質  $\text{PA 62}$  のカラムから洗脱した。洗脱は、1 mM の  $\text{NaCl}$ 、1 mM の  $\text{EDTA}$ 、0.5% の酢酸ナトリウ

ムを含む溶液で、pH 8.0 中でインキュベートすることにより、純

度を確認する試料に除去された。アミンタンパク質を  $\text{Centric}$ 

10 (Amicon) 上で 5000 回転に達した。その後水を加えて

2 回、及び 0.1% の  $\text{KCl}$  を用いて 2 回洗脱して再濃縮した。アミンタンパク質は純度で洗脱する傾向があるが、0.1% の  $\text{KCl}$  に加えて洗脱した。アミンタンパク質を  $\text{NaCl}$  の中で 10 mM に4.5 mM で洗脱して洗脱し、その後洗脱液の  $\text{pH}$  (NTA) で調整

した。

組み立て F-2/N の完全な免疫沈降 細胞の抽出液を免疫沈

降し、洗脱液の成分で免疫沈降の組み立て F-2/N の洗脱液を

洗脱した (Foster, W. B. et al. (1982) Transmembr. 2: 684-691)。

タンパク質分析-酵素分解-酵素分解 F-2/N (Lieberman-Zins, J. and Brew, K. (1

ラム (2.5 x 8.0 cm) に再溶解した。

その後カラムを両端から  $\text{NaCl}$  の緩衝液 (0-0.3M) を用いて洗脱した。洗脱液を 10 分間分けて  $\text{NaOH}$  -PA 62 に

より分析し、組み立てタンパク質 (M 37, 000) を含む成分を集

めた。そのような成分は、細胞抽出液からの 10 分間分けたの

トランスフェリン及びアルブミンを含む。最初の成分は  $\text{Amino P}$ 

M-10 膜上で 5 mM に溶解した。タンパク質を、100 mM の

水素アミンで中和化した  $\text{Sephadex G-75 Superfine}$  (Pharmacia-PL Biochemicals)

のカラム (2.5 x 9.0 cm) 上のイオン交換にかけた。

タンパク質を 100 mM の  $\text{NaCl}$  で完全に洗脱するために、このカ

ラムを通して 2 個目のクロマトグラフィー洗脱が必要と見られる。この

洗脱で  $\text{Amino P}$  は洗脱され、0 であり、内相ヘムタンパク質 (お

そらくヘムタンパク質) の存在を示している。F-2/N は、50 mM

のトリス-HCl, pH 8.0 中の  $\text{NaCl}$  の緩衝液 (0-0.3M) を用いて  $\text{Polyacrylamide}$  (Pharmacia) のカラム (1x 10 cm) 上で 1 ml/分の流量にて 1 時間かけて  $\text{PA 62}$  に

分析に用いて分析した。3 mM の成分を集めた。タンパク質の純

度を確認するために 2-4 倍のタンパク質  $\text{PA 62}$  のカラムから洗脱した。5% -12% 硝酸アミンを用いて  $\text{NaOH}$  -PA 62 洗脱液、Mahey, D. O. and Seef, U. S. (1978) Biochem. Biophys. Res. 64: 250-255 の方法に従って  $\text{Brown-Brown}$ 、A. and Woodworth, R. C. (1984) J. Biol. Chem. 259: 1866-1870 の方法に従って  $\text{PA 62}$  を行った。1.10 mL のガラスカラム(LKB) 中の 0-50% グラウソス上に 3% の  $\text{Pharm}$ 

alytic, pH 5-8 (Pharmacia) を用いて電気泳動液を

行った。カラムは 1000 V にて 20 mA の最終電流に電圧を調整した。

0.2 mL 中の試料を溶液の半分から回収したものを 0.2 mL の溶液で溶解し

た。その後試料をカラムの表面に滴下し、電圧を 2 時間かけて

た。均相のカラムの底から、0.2 mL の溶液で洗脱した。各成分を  $\text{A}_1$ 及び  $\text{A}_2$  に分けて分析した。各成分  $\text{A}_1$  を含む部分、アミン及び純度を確認するために 2-4 倍のタンパク質  $\text{PA 62}$  のカラムから洗脱した。洗脱は、1 mM の  $\text{NaCl}$ 、1 mM の  $\text{EDTA}$ 、0.5% の酢酸ナトリウ

ムを含む溶液で、pH 8.0 中でインキュベートすることにより、純

度を確認する試料に除去された。アミンタンパク質を  $\text{Centric}$ 

10 (Amicon) 上で 5000 回転に達した。その後水を加えて

2 回、及び 0.1% の  $\text{KCl}$  を用いて 2 回洗脱して再濃縮した。ア

etにおける5, 872 Tcsls Bruker WM NMR  
スペクトルメーターにて、核磁場を(quadra lre de  
clon)を用いたフリーシールモードで操作してプロトン及びフ  
ッ素NMRスペクトルを得た。\*Fプローブはその前門のDr. Char  
siohar W Al Jemに成り換えられた。プロトンスペク  
トルの場合、スペクトルメーターの磁石は磁石の通りであった(Valc  
our, A. A. and Woodworth, R. C. (1987)  
Biochem Biophys Res Commun, 150: 3120-3125)。\*Fスペク  
トルの場合、磁石は30, 00MHzであり、アキュレーション時間は  
0.275秒であり、アキュレーションは15, 01s(500)のバル  
スの間に20秒のレラキゼーション(ecler delay)  
が介在し、磁石は300MHzであった。\*F化学シフトはH<sub>2</sub>O中の0  
1Mのメソクシカルに於ける。タンパク質は0.1mLの99.8  
重量% H<sub>2</sub>O中の8-10mgであり、スペクトルは\*F<sub>2</sub>Oを含む加圧  
5mm NMR管に挿入された。1mLの溶液中のこれらの試料  
につき産生した。\*Fスペクトルの自由誘導減衰(free indu  
clon decay)につき、フリーシフトの前に30Hzのサイ  
ンブロードニングを行った。

# 結果

ヒトTF<sub>2</sub>cDNAの転写 ヒトTF<sub>2</sub>cDNA用組換え体としてヒ  
トTF<sub>2</sub>cDNAの5' 配列の24塩基ポリヌクレオチドを用い、ヒ  
トTF<sub>2</sub>cDNAライブラリ(Promega Biotech, E. V. 1, 3,  
4, (1983) J. Biol. Chem., 258: 8389-839  
4) の約100, 000個のコロニーをスクリーニングした。1個の

株のコロニーを得た。このコロニーから抽出されたプラスミドの塩濃  
(extensive) 2回再洗浄後には、Yoon, P. 4,  
5, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA,  
81: 2752-2755により同一のタイプであり続ける複製された  
TF<sub>2</sub>cDNAから予想されるタンパク質と完全に一致した。このコロ  
ニーの5' 一塩基3' 一塩基のDNA配列分析は、それがamss  
1, により構築された全一塩基クローンと一致であることを確認した。  
このcDNAの制限酵素消化及びサブクローニングの結果はそれ  
の後の配列分析すべて以前に報告された配列に正確に一致した。  
ベクター-挿入及び制限 2回の制限酵素コドン及び1回のHind  
III制限酵素をヒトTF<sub>2</sub>cDNA配列のアミノ酸及びカルキニ素  
低pHの間のリンカー領域に、ポリグロコチド-塩酸突然変異  
誘発により導入した。この誘発からの突然変異誘発は、直後TF<sub>2</sub>  
番号計数規則に従いAmss-337で終わる(MacGillivray,  
R. T. A. 5, 1, (1983) J. Biol. Chem.,  
258: 3543-3553)。

変異ベクターpMT(Palmiter, R. D. 4, 4, (1  
987) Cell (Cambridge, MA) 50: 435-443)  
はマウスミトコンドリアN1/1点変異カルキニ素塩基特異性含有、  
これは変異誘発マウスにおいて多量にヒト低カルキニ素を誘発すること  
が示された(Palmiter, R. D. 4, 4, (1983) S  
cience (Washington, D. C.) 222: 809-8  
14)。このベクターの長期的な維持のために、マウスミトコン  
ドリアプロトタイプに適合する配列でcDNAを複製させること、5,

6, 7) 中でpMT18型質の複製及び選択を可能にし、SV40初期  
プロモーターにより誘導されたヒトTF<sub>2</sub>転写因子(HTF<sub>2</sub>)  
cDNAの開始塩基性における選択を可能にすることが出来る。HTF<sub>2</sub>  
cDNAは、転写因子を用いたトランスフェクション(Transfection)  
の約270-1000倍の増殖率をコードする(Simonson,  
C. C. and Levison, A. D. (1983) Proc.  
Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2495-2499)。  
これは、トランスフェクションされた細胞を完全に洗脱(0.5mM)  
のNTX中で塩析することによって、HTF<sub>2</sub>の平均した変異後  
増殖率の必要後を誘発する。

変異ベクターpMT-HTF<sub>2</sub>cDNAの複製のために、バクテリア  
変異ベクターからBamHI-HindIII(アグメント)を準備した  
(図1)。最初のトランスフェクションはBamHIからの「pMT1  
-BamIII」アグメントと制限した(図1)。その後これらの2つの  
アグメントを、AccI及びHindIIIを用いて切断した13  
塩基の複製型形質因子A中へ挿入した。得られた約15アグメント  
の複製型形質因子Aを脱塩し、XbaI及びHindIIIを用い  
て切断することにより挿入を脱塩し、変異を脱塩した。これ  
らの変異は、アグメントが制限型シグナルを含み、タンパク質のた  
めの天然のシグナル配列を保持し、変異のベクター中にあるcDNA  
配列を含み得ることを保証する(図1)。このアグメントを5mM  
一塩基NTX中で挿入し、かきしてヒト低カルキニ素塩基特異性TF<sub>2</sub>  
cDNAと変換する制限型塩基カルキニ素塩基特異性からの転写停  
止シグナルはそのまま残った。このプラスミドをBamHI制限中にトラン

スフェクションし、得られた変異型低カルキニ素の存在で選択した。  
トランスフェクションされたBamHI制限により製造されたcDNAを  
変異の分析のために、カルキニ素塩基の存在下でポリヌクレオチド  
全RNAを電気泳動させた(Mallat, T. 5, 1, (1  
982) Molecular Cloning, Lab. 4, 4,  
J. Manual, Cold Spring Harbor Lab  
oratory, Cold Spring Harbor, NY)。ニ  
トロセルロース上に移した後、ハイブリング溶液で洗ったcDNA  
塩基の3' 末端塩基に於けるポリグロコチドを用いてプロット  
を分析した。トランスフェクションされた細胞で約1, 4kbの長さ  
cDNAが検出されたが、最初の検出はBamHI制限で検出されたもの  
(データは示していない)。これはcDNAの3' 末端塩基配列及びA  
塩基を含むHTF<sub>2</sub>cDNAの複製型塩基と一致した。

変異型低カルキニ素塩基により製造されたポリヌクレオチドの分析のた  
めに、種々の塩基塩基の塩基塩基と及び塩基塩基の両方についてウェス  
トブロット分析を行った(図2)。BamHI制限、cDNA-ポリヌクレ  
オチドを含むBamHI制限塩基HTF<sub>2</sub>cDNA-ポリヌクレオチドを含む  
BamHI制限の試料をDME (BamHI制限)又はDME-MTX (p  
MTベクターを含むBamHI制限)中で培養した。細胞が洗脱しに  
塩基塩基の塩基塩基と一致し、塩基塩基を脱塩した。これらの試料を精  
製してウェスト-HTF<sub>2</sub>塩基塩基及びカルキニ素-固定S アクリルS  
(S, 5, 1, (1986) J. Biol. Chem., 261: 809-814) 処理と共にインキュベートして(Von Oost, R.  
A. 5, 1, (1986) J. Biol. Chem., 261: 809-814)。  
5, 1, (1986) J. Biol. Chem., 261: 809-814)。

NとDの両方とも同時にインキをペーストし、両方のグラフを1/2の幅  
 で横向きに動かす。エトロン系はペーストに際してより高粘タンパク  
 質を添加した。その結果はグラフより2/3程度の粘着性のあるインキスフ  
 ァーと混合した方が使い易いことが観察・プログラムと共にインキペー  
 ーシした。2月1日開始からの印刷テスト結果は地味色(図2、1月測  
 びより1色)、あるいは白・黒の2色で印刷できることを示す。また、  
 印刷の品質(図2)は良好で、2、3色印刷でも十分である。また、  
 黒色のヒンジが1色で印刷から容易に得られるヒンジ色度プログラムバ  
 ンド(図2、5.000及び5.000)が少量の量で良好な印刷品質の  
 印刷を得た。しかし、黒色で印刷するプログラムバンドを色度バ  
 ンド範囲の印刷テスト(図2、3月測り)では、黒色(図2、3月測り)  
 中に、さらに黒色 3.7、0.00のバンドが観察された。この印刷プロ  
 グラムの分析では、2/3の割合から算出されたヒンジ/2成分の分析  
 (図2、3月測り)と一致している。

ヒマノ/2N生物物の培養は、SDS-PAGE上で細胞ライセート及び分泌液が泳動した際のシグナル配列の除去を示す。沈降物中にラシテアがほとんど現れないので第一液滴はヒマノに特異性が高いことがわかる。

図8に示すように、 $\text{H}^{+}$ と $\text{N}^{+}$ の濃度は、 $\text{H}^{+}$ と $\text{N}^{+}$ の濃度の比が1000に達するまで、 $\text{H}^{+}$ と $\text{N}^{+}$ の濃度の比はほぼ一定である。この結果は、 $\text{H}^{+}$ と $\text{N}^{+}$ の濃度の比が1000に達するまで、 $\text{H}^{+}$ と $\text{N}^{+}$ の濃度の比はほぼ一定である。

組み換えhTF/2Nの製法及び特徴　組み換えhTF/2Nを3段階連続により精製し、それはラジオイムノアッセイに基づいて90%の感度で癌細胞のタンパク質を目的に与える。Pollution

8)上の系統の例は、フレア・PAGC (図3、パネルC) により確認される通り、PAGC質の主要成分(＜6μm)はほぼ全量分岐(図3、パネルA)の両方のアーク及び第一物性相を重量比に分離した。フレア・PAGCでは幾何学的に類似した分岐モードで2μm以下、移動の速い成分はForth F/2μmであることに注意してほしい。SUS-PAGCモデル(図3、パネルB)は、主要成分及び主要成分のみを分岐モードで2μmは、相分量の相分岐であり、主要成分FAGC色により図3左側の色に近い(データは示していない)ことを示す。

[illegible]

TF/2Nの場合の $\eta$ はそれぞれ8.5, 5及び5.4であった。  
 赤外吸収及び質量分析の両方の結果を比べTF/2Nのアニン-年製純  
 別分析は、由緒からの由々もTF下の場合に見いだされた結果と同一の  
 結果を与えた(Miscellaneous, R. T. A. 41 91  
 (1983) 1, 31 1 Chem. 25 9: 3543-3553)  
 (巻末)

進み型スラング質のプロトンNMRスペクトル(図5)は、タンパク質分解・誘導液FとNのスペクトルと非常に似ている(Vallentyne, A. A. and Woodworth, R. G., 1967, *Biochemistry* 6, 202; 3: 202-312)が、粗めくタンパク質の量の方が異質線は強い。M-D-アッセイを施行した培養地上で成した細胞培養から精製したタンパク質のNMRスペクトル(図6)は、4つの十分に分離した共振を示し、2つは知られた純物質(シロイ)と一致する。

## 21

とトランスフェリン及び胆汁酸とトランスフェリン?ノ末路  
星一分子のミミノ半分解型

モノバク質	アミノ酸配列	参照
ヒト血清	Y-P-Q-E-T-S-R-R-C-A-Y-G	McGillivray
トランスフェリン		02 頁 (1983)
猪血漿	Y-P-Q-E-T-S-R-R-C-A-Y-G	本報告
ヒトγ2M (主要)		

hTF/2N (非主型)

「遺伝子ハフ/2N法」は、Applied Biosystems 470A シンクアンプシステムで決定した、約500の塩基の各断片を分析した。12シーケンサーサイクルを分析した。「サイクル」では既述は固定されなかった。しかし分析の際にはシステムエラーは修正された。シーケンサーサイクルを分析した。

塩基置換DNA法を用いることにより、いくつかの塩基置換法で利用してシンクアンプ分析により得られた塩基置換法を提示するハフ/2N法を製造する。これは、この塩基置換法シンクアンプの塩基置換法を、塩基置換法シンクアンプシステムで決定された塩基置換法で修正された。

[illegible]







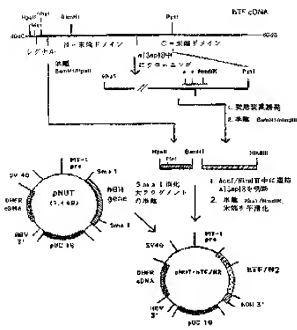


FIG. 1

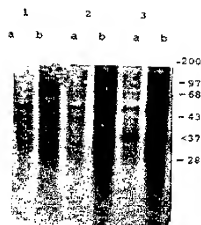


FIG. 2

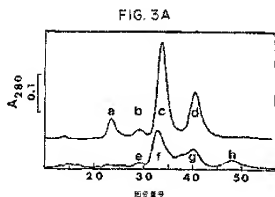


FIG. 3A

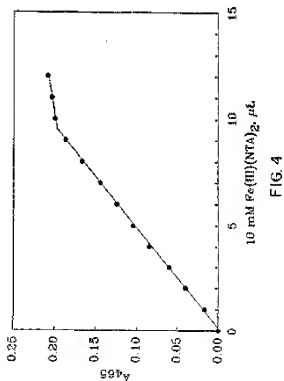
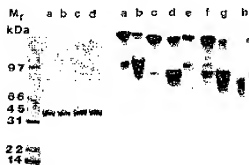


FIG. 4

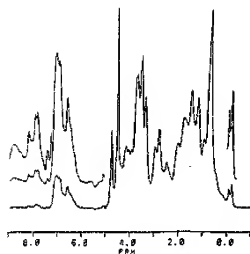


FIG. 5A

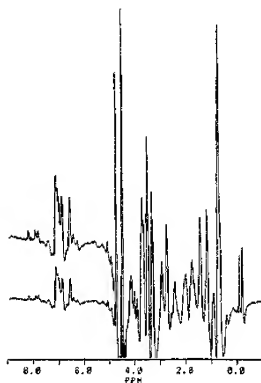


FIG. 5B

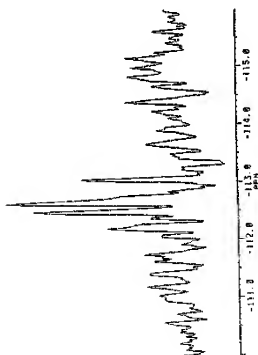


FIG. 6

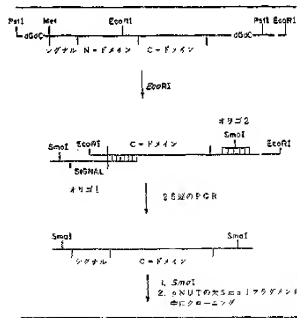


FIG. 7

平成5年8月9日

特許庁長官 麻 生 滋 殿

1. 特許出願の概要

PC7-05922/00928

2. 発明の名称

組み替えトランスフェロン、トランスフェリン単一分子、及びそれらの発用装置

3. 特許出願人

法 国 アメリカ合衆国パーマート社05405バージョン  
(未知なし)

名 称 ゼ・ユニバーシティ・オブ・パーマート・アンド・ステイト・  
アドリカニエタル・カレッジ (ほか1名)

4. 代理人

代 理 東京新居町赤坂1丁目6番15号  
日本日報新聞社  
代 理 (5075) 伊藤士 小 崎 嘉 平 君  
電 話 3 5 8 5 - 2 2 5 6



5. 特許書の提出年月日

1993年8月4日

6. 特許書の内容の要約

(1) 補正書の写し (翻訳文)

1 表



発明の要約

9. 他の哺乳類タンパク質を含まない遺伝的産物哺乳類トランスフェリンの基本的に特異な複製物。

10. 他のヒト血漿タンパク質を含まない統一融合ヒト血漿トランスフェリンの基本的に特異な複製物。

11. a) トランスフェリンをコードするDNAを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた細胞組織を、トランスフェリンを産生させる条件下で培養し。

b) 発現されたトランスフェリンを回収する装置を含む、遺伝的産物哺乳類トランスフェリンの製造法。

12. ベクターがプラスミドDNAである、請求の範囲1に記載の方法。

13. 遺伝的産物がベビーハムスター腎臓細胞である、請求の範囲1に記載の方法。

14. a) トランスフェリンの誘導可能プロモーターに作動性に結合した、トランスフェリン又はその一部をコードするDNAを含む発現ベクターを用いてトランスフェクションされた細胞組織を培養し。

b) プロモーターを誘導してトランスフェリンの発現を誘発し。

c) 発現されたトランスフェリンを回収する装置を含む、複製的産物哺乳類トランスフェリンの製造法。

15. プロモーターが遺伝的産物可能タロチオニンプロモーターである、請求の範囲14に記載の方法。

16. a) 請求の範囲12に記載の発現ベクターを用いてトランスフェクションされた細胞組織をトランスフェリンを産生させる条件下で培養

発 明 の 説 明

1. 哺乳類トランスフェリンのAミナ基質を含む遺伝的産物は基本的に哺乳類トランスフェリンのカルボキシル基を含む突出部を含む、複製的産物トランスフェリン単一分子。

2. 少なくともトランスフェリンの1番目の突出部の金属-結合ドメインを含む、他の突出部の金属-結合ドメインを含む。天然状態では金属に対して天然の哺乳類トランスフェリンの結合より強い結合力を有する。複製的産物天然哺乳類トランスフェリン単一分子。

3. 鉄に対して天然の哺乳類トランスフェリンより強い結合力を有する、請求の範囲2に記載の発用装置トランスフェリン単一分子。

4. 少なくともトランスフェリンの1番目の突出部の金属-結合ドメインを含む。天然の哺乳類トランスフェリンの位置2番目のシリン残基がグルタミンにより置換されている、請求の範囲3に記載の発用装置トランスフェリン単一分子。

5. 少なくとも哺乳類トランスフェリンのカルボキシル基を含むトランスフェリンの1番目の突出部の金属-結合ドメインを含む、他の突出部の金属-結合ドメインを含まない哺乳類トランスフェリンの複製的産物単一分子を金属の濃度を調整して下げるのに十分な量を含む、金属キレート化装置で用いるための発用装置組織。

6. 金属が鉄である、請求の範囲5に記載の発用装置組織。

7. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンより強く金属に結合する複製装置である、請求の範囲5に記載の発用装置組織。

8. トランスフェリン単一分子が天然のトランスフェリンのシリン残基の代わりに位置2番目にグルタミン残基を含む、請求の範囲5に記載の

し、

b) 発現されたトランスフェリンを回収することにより製造された、基本的に他の哺乳類タンパク質を含まない複製的産物哺乳類トランスフェリン。



フロントページの続き

(51)Int. Cl. *	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 P 21/02	Z N A C	9282-4B	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:91)			
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			
	8412 -4B		
		C 1 2 N 5/09	B
		//(C 1 2 N 15/09	Z N A A
		C 1 2 R 1:91)	
(72)発明者	フランク、 ウォルター・デイ	(72)発明者	メイソン、 アン・ビー
	アメリカ合衆国テキサス州75243ダラス・		アメリカ合衆国バーモント州05445シャー
	アパートメント2202・オードリアロード		ロット・ノースグリーンブツシユロード
	11991		(番地なし)
(72)発明者	マツギリブレイ、 ロス・テイ・エイ	(72)発明者	ウツドワース、 ロバート・シー
	カナダ国ブイ6テイ 1テイ7・ブリテイ		アメリカ合衆国バーモント州05482シエル
	ツシユコロンビア・バンクーバー・アリソ		バーン・ローガンレイン4
	ンロード2233・アパートメント907		